

• 实验研究 •

毛蕊花糖苷对棕榈酸处理的 HepG2 细胞线粒体保护作用研究

伊力亚斯·艾萨^{1,2,3}, 木塔力甫·艾买提⁴, 任丽君^{1,2,3}

1. 新疆和田学院, 新疆 和田 848000
2. 新疆和田特色中医药研究重点实验室, 新疆 和田 848000
3. 新疆和田民族医药工程技术研究中心, 新疆 和田 848000
4. 新疆医科大学, 新疆 乌鲁木齐 830000

摘要: 目的 探讨毛蕊花糖苷对棕榈酸处理的 HepG2 细胞线粒体保护作用, 并探讨其作用机制。方法 将 HepG2 细胞设置为对照组、棕榈酸 (100 $\mu\text{mol/L}$) 组、毛蕊花糖苷 (50 $\mu\text{mol/L}$) 组、棕榈酸 (100 $\mu\text{mol/L}$) + 毛蕊花糖苷 (50 $\mu\text{mol/L}$) 组。MitoSox 荧光探针在激光共聚焦显微镜下检测线粒体超氧化物水平的变化; JC-1 荧光探针在激光共聚焦显微镜下观察线粒体膜电位的改变; Tomm20、微管相关蛋白轻链 3 (LC3) 特异性抗体进行免疫荧光染色, 观察共定位情况; 线粒体提取试剂盒提取 HepG2 细胞内线粒体, 蛋白质免疫印迹技术检测线粒体上 LC-3II 蛋白相对表达水平的变化。结果 棕榈酸组细胞内 MitoSox 红色荧光显著增强 ($P < 0.05$), 棕榈酸 + 毛蕊花糖苷组 HepG2 细胞内红色荧光强度显著降低 ($P < 0.05$); 棕榈酸组 HepG2 细胞内绿/红荧光强度比例显著升高 ($P < 0.05$), 棕榈酸 + 毛蕊花糖苷组 HepG2 细胞内绿/红荧光强度比例显著降低 ($P < 0.05$); Tomm20 和 LC3 共定位分析结果显示, 棕榈酸组线粒体与 LC3 在空间上没有明显的共定位, 棕榈酸 + 毛蕊花糖苷组 HepG2 细胞内线粒体形态完整, 线粒体与 LC3 显示出明显的共定位; 蛋白质免疫印迹结果显示, 与棕榈酸组比较, 棕榈酸 + 毛蕊花糖苷组 HepG2 细胞内线粒体上 LC3-II 蛋白相对表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。结论 在棕榈酸处理的 HepG2 细胞模型中, 毛蕊花糖苷可能通过诱导线粒体自噬发挥线粒体保护作用。

关键词: 毛蕊花糖苷; 棕榈酸; HepG2 细胞; 线粒体; 微管相关蛋白轻链 3

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2025)08-1873-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2025.08.001

Protective effect of acteoside on mitochondria of HepG2 cells treated with palmitic acid

YILYASI Aisa^{1,2,3}, MUTALIFU Aimaiti⁴, REN Lijun^{1,2,3}

1. Xinjiang Hetian College, Hetian 848000, China
2. Key Laboratory of Xinjiang Hetian Characteristic Chinese Traditional Medicine Research, Hetian 848000, China
3. Engineering Research Center of Xinjiang Hetian Traditional Chinese and Ethnic Medicine, Hetian 848000, China
4. Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China

Abstract: Objective To investigate the protective effect of acteoside on mitochondria of HepG2 cells treated with palmitic acid, and to explore its mechanism. **Methods** HepG2 cells were set as the control group, palmitic acid (100 $\mu\text{mol/L}$) group, acteoside (50 $\mu\text{mol/L}$) group, and palmitic acid (100 $\mu\text{mol/L}$) + acteoside (50 $\mu\text{mol/L}$) group. Changes in mitochondrial superoxide levels were detected by MitoSox fluorescent probes under a laser confocal microscope. The JC-1 fluorescent probe was used to observe the changes of mitochondrial membrane potential under a laser confocal microscope. Immunofluorescence staining was performed with Tomm20 and LC3 specific antibodies to observe the co-localization situation. Mitochondria were extracted from HepG2 cells using the mitochondrial extraction kit, and the changes in the relative expression level of LC-3II protein on mitochondria were detected by

收稿日期: 2025-03-25

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目 (2022D01B41); 新疆维吾尔自治区医学专科学校自然科学基金重点实验室开放课题项目 (SYS2024-002)

作者简介: 伊力亚斯·艾萨, 博士, 研究方向为中药药效物质基础及机制研究。E-mail: elyas_ai@163.com

Western blotting. **Results** The red fluorescence of MitoSox in the cells of the palmitic acid group was significantly enhanced ($P < 0.05$), while the intensity of red fluorescence in the cells of HepG2 in the palmitic acid + acteoside group was significantly decreased ($P < 0.05$). The ratio of intracellular green/red fluorescence intensity in HepG2 cells in the palmitic acid group was significantly increased ($P < 0.05$), while the ratio of intracellular green/red fluorescence intensity in HepG2 cells in the palmitic acid + acteoside group was significantly decreased ($P < 0.05$). The results of Tomm20 and LC3 co-localization analysis showed that there was no obvious co-localization of mitochondria and LC3 in space in the palmitic acid group, while the mitochondria morphology in HepG2 cells was intact, and mitochondria and LC3 showed obvious co-localization. The results of Western blotting showed that the relative expression levels of LC3-II protein on mitochondria in HepG2 cells in the palmitic acid + acteoside group were significantly increased compared with those in the palmitic acid group ($P < 0.05$). **Conclusion** In HepG2 cells treated with palmitic acid, acteoside may exert mitochondrial protection by inducing mitochondrial autophagy.

Key words: acteoside; palmitic acid; HepG2 cells; mitochondrial; LC3

随着肥胖和 2 型糖尿病患病率的上升, 代谢相关脂肪性肝病正迅速成为全球性健康问题^[1]。目前, 针对代谢相关脂肪性肝病主要通过合理的饮食和适当的运动等生活方式, 减轻体质量以及提高胰岛素敏感性, 减轻其病理进程。虽然二甲双胍、他汀类药物和贝特类药物作为代谢相关脂肪性肝病的治疗方法, 但由于这些药物具有诱发感染和增加骨质疏松等不良反应。因此, 进一步深入阐释代谢相关脂肪性肝病疾病发生发展机制以及探索安全、高效的治疗方法成为亟需解决的科学难题。

一般来说, 代谢相关脂肪性肝病患者由于肝脏脂质代谢失常导致肝细胞内三酰甘油 (TG) 和胆固醇的异位沉积^[2-3]。由于肝细胞中包括脂质在内的多种物质代谢过程所需能量与线粒体密切相关, 故线粒体作为“细胞的发电站”为细胞内各种物质代谢过程提供能量。除了产生能量, 线粒体在正常生理中还发挥多种作用, 包括产生活性氧 (ROS) 以及调节生物合成代谢和细胞信号传导^[4]。因此, 线粒体的质量、数量和功能对细胞行使正常生理功能发挥重要作用。最近研究指出, 线粒体功能障碍与代谢相关脂肪性肝病的进展存在相关性^[5]。在代谢相关脂肪性肝病中, 线粒体 ROS 产生增多、膜电位改变以及动力学失去平衡, 导致线粒体网络破碎和功能障碍, 引起线粒体产生的 ATP 减少, 使其更易受到氧化应激的影响, 最终导致脂肪积累和炎症。

毛蕊花糖苷是从肉苁蓉植物中分离出来的一种苯乙醇苷^[6]。课题组前期研究结果发现, 毛蕊花糖苷在 HepG2 细胞内具有显著的自噬诱导能力, 同时在棕榈酸处理的肝脂肪变性细胞模型中, 50 $\mu\text{mol/L}$ 毛蕊花糖苷能显著减少细胞内 TG 含量^[7]。然而, 毛蕊花糖苷在改善 HepG2 细胞脂质异位沉积过程中对线粒体的保护作用及其可能作用机制尚

未见相关报道。基于此, 本研究利用棕榈酸处理 HepG2 细胞, 利用毛蕊花糖苷干预后检测线粒体相关指标, 探索毛蕊花糖苷对棕榈酸处理的 HepG2 细胞线粒体的影响及其相关分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料

HepG2 细胞购自于武汉普诺赛生命科技有限公司, 毛蕊花糖苷 (批号 B20715, 质量分数 $\geq 98\%$) 购自上海源叶生物公司, 二甲基亚砜 (批号 D8418)、棕榈酸 (批号 P9767) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司, DMEM 高糖基础培养基 (批号 SH30022.01)、磷酸盐缓冲液、胰蛋白酶购自 HyClone 公司, 胎牛血清 (批号 04-001-1A) 购自以色列 BI 公司, 青霉素/链霉素 (批号 15640055) 购自 Gibico 公司, MitoSox Red (批号 M36008) 购自美国 Invitrogen 公司, 无菌盖玻片 (批号 80346-0910) 购自江苏世泰实验器材有限公司, 线粒体膜电位检测试剂盒 (批号 M8650)、线粒体提取试剂盒 (批号 SM0020) 购自北京索莱宝科技有限公司, 微管相关蛋白轻链 3 (LC3) 抗体 (批号 PM036, 稀释比例 1 : 1 000) 购自日本 MBL 公司, Tomm20 抗体 (批号 Ab283317, 稀释比例 1 : 1 000) 购自英国 Abcam 公司, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 抗体 (批号 5014S, 稀释比例 1 : 1 000)、细胞色素 C 氧化酶亚基 IV (COX IV) 抗体 (批号 4844, 稀释比例 1 : 1 000) 购自美国 CST 公司, Alexa Fluor™ 488 (批号 A-11001, 山羊抗鼠 IgG, 稀释比例 1 : 5 000) 荧光二抗、Alexa Fluor™ 546 (批号 A-21070, 山羊抗兔 IgG, 稀释比例 1 : 5 000) 购自美国 Invitrogen 公司, HRP 标记的二抗 (批号 4055-05, 稀释比例 1 : 5 000) 购自美国 Southern Biotech 公司, ECL 化学发光试剂盒 (批号 32109) 购自美国 Thermo Fisher 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 HepG2 细胞培养 HepG2 细胞用含 10%胎牛血清、1%青/链霉素、1%谷氨酰胺的高糖 DMEM 培养基,置于 5% CO₂、37 °C 恒温保湿培养箱中培养,待细胞汇合率达 80%后,进行传代培养。

1.2.2 线粒体超氧化物水平的检测 将 HepG2 细胞以 2.5×10^4 个/孔接种于四孔玻底培养皿中,设置对照组、棕榈酸组、毛蕊花糖苷组、棕榈酸+毛蕊花糖苷组。待细胞贴壁后,棕榈酸组使用 100 $\mu\text{mol/L}$ 棕榈酸处理,毛蕊花糖苷组使用 50 $\mu\text{mol/L}$ 毛蕊花糖苷进行处理,棕榈酸+毛蕊花糖苷组在棕榈酸处理的基础上同时给予 50 $\mu\text{mol/L}$ 毛蕊花糖苷进行处理。待细胞培养 24 h 后,各组细胞加入 MitoSox Red 荧光探针,培养箱中避光孵育 30 min,于激光共聚焦显微镜下观察荧光强度。

1.2.3 线粒体膜电位的检测 将细胞按照 1.2.2 项下进行分组及处理,待细胞培养 24 h 后,各组细胞以 250 μL /孔更换新鲜培养基,同时加入 250 μL JC-1 染色工作液,置于培养箱中避光孵育 20 min。JC-1 染色缓冲液清洗 2 次,更换新鲜培养基,于激光共聚焦显微镜下观察荧光强度。

1.2.4 免疫荧光检测 Tomm20 与 LC3 共定位情况 将 HepG2 细胞以 1×10^5 个/孔接种于铺有无菌盖玻片的 3.5 cm 培养皿中,按照 1.2.2 项下方法对细胞进行分组及处理。待细胞培养 24 h 后,轻轻取出无菌盖玻片,吸去培养液,无菌 PBS 清洗细胞,4%多聚甲醛室温固定 10 min,皂素透化缓冲液室温透化 15 min,山羊血清室温避光封闭 30 min,利用抗体稀释液(含有 0.1%皂素、10%山羊血清)按照比例稀释一抗后,室温孵育 1 h, PBS 清洗后利用二抗室温避光孵育 1 h,封片剂封片后于激光共聚焦显微镜下观察并拍照,检测 Tomm20 与 LC3 共定位情况。

1.2.5 线粒体 LC-3 II 蛋白质表达水平的检测 将 HepG2 细胞以 2×10^6 个/孔接种于 6 cm 培养皿中,设置对照组、棕榈酸组、棕榈酸+毛蕊花糖苷组。待细胞贴壁后,棕榈酸组使用 100 $\mu\text{mol/L}$ 棕榈酸进行处理,棕榈酸+毛蕊花糖苷组在棕榈酸处理的基础上同时给予 50 $\mu\text{mol/L}$ 毛蕊花糖苷进行处理。待继续培养 24 h 后,加入 RIPA 裂解液充分溶解,线粒体提取试剂盒提取各组细胞线粒体,收集各组细胞线粒体蛋白和胞浆蛋白,BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度,100 °C 加热变性 15 min 后,经 SDA-PAGE 凝胶电泳,转印至 PVDF 膜,5%脱脂牛奶室

温封闭 2 h,加入特异性一抗 4 °C 孵育过夜, PBST 洗膜 3 次,每次 15 min,辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1 h, PBST 洗膜后经 ECL 发光试剂盒显影, Image J 软件对目标条带进行灰度值分析。

1.2.6 统计学方法 本研究采用 SPSS 25.0 统计软件对实验数据进行分析和处理。符合正态分布的计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步组间比较采用 LSD 法。

2 结果

2.1 毛蕊花糖苷对棕榈酸处理的 HepG2 细胞线粒体超氧化物水平的影响

结果显示,棕榈酸处理 HepG2 细胞后,细胞内可明显观察到较强的红色荧光,毛蕊花糖苷干预棕榈酸处理的 HepG2 细胞后,细胞内红色荧光显著减弱。对各组细胞红色荧光强度进行单因素方差分析,结果显示,棕榈酸组细胞内红色荧光强度显著升高 ($P < 0.05$);与棕榈酸组比较,棕榈酸+毛蕊花糖苷组 HepG2 细胞内红色荧光强度显著减弱 ($P < 0.05$),见图 1。

2.2 毛蕊花糖苷对棕榈酸处理的 HepG2 细胞线粒体膜电位的影响

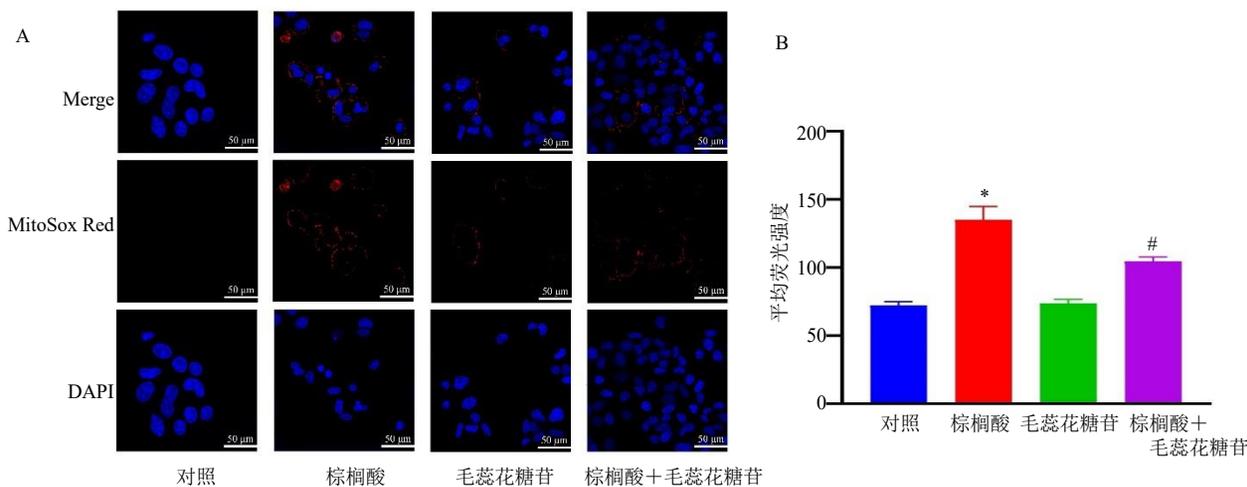
结果显示,棕榈酸处理 HepG2 细胞后,细胞内可明显观察到较强的绿色荧光,毛蕊花糖苷干预棕榈酸处理的 HepG2 细胞后,细胞内绿色荧光显著减弱。对各组细胞绿/红荧光强度比例进行单因素方差分析,结果显示,棕榈酸组细胞内绿/红荧光强度比例显著升高 ($P < 0.05$);与棕榈酸组比较,棕榈酸+毛蕊花糖苷组 HepG2 细胞内绿/红荧光强度比例显著降低 ($P < 0.05$),见图 2。

2.3 毛蕊花糖苷对棕榈酸处理的 HepG2 细胞 Tomm20 与 LC3 共定位的影响

如图 3 所示,棕榈酸处理后细胞内线粒体形态不完整;Tomm20 和 LC3 共定位分析结果显示,线粒体与 LC3 在空间上没有明显的共定位;毛蕊花糖苷干预棕榈酸处理的 HepG2 细胞后,细胞内线粒体形态完整,线粒体与 LC3 显示出明显的共定位。

2.4 毛蕊花糖苷对棕榈酸处理的 HepG2 细胞线粒体 LC3-II 蛋白水平的影响

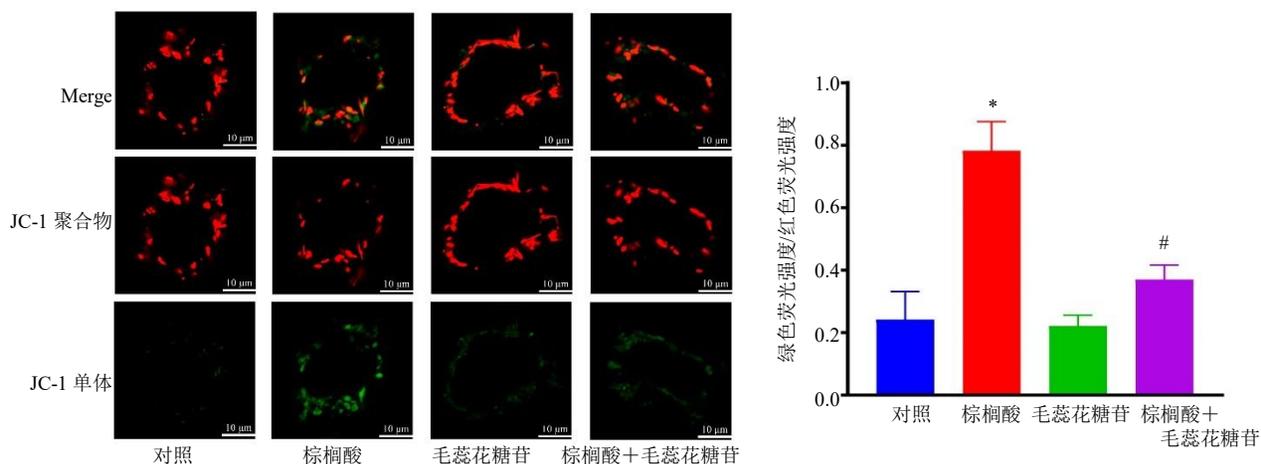
为了进一步确认线粒体上 LC3-II 蛋白水平,采用蛋白质免疫印迹法检测了 LC3-II 蛋白质表达水平(相对于 COX IV 的表达量)。进一步采用 LSD-t 法对各组细胞线粒体上 LC3-II 蛋白表达水平进行两两比较,结果显示,棕榈酸处理后 HepG2 细胞内线粒



A: MitoSox Red 活细胞染色, B: 红色荧光强度灰度值分析结果; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与棕榈酸组比较: # $P < 0.05$ 。
A: MitoSox Red live cell staining, B: analysis results of the gray value of the red fluorescence intensity; * $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs palmitic acid group.

图 1 毛蕊花糖苷对棕榈酸处理的 HepG2 细胞线粒体超氧化物水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of acteoside on the mitochondrial superoxide levels of palmitic acid-treated HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



A: JC-1 活细胞染色, B: 细胞内绿/红荧光强度比例分析结果; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与棕榈酸组比较: # $P < 0.05$ 。
A: JC-1 live cell staining, B: analysis results of the ratio of intracellular green/red fluorescence intensity; * $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs palmitic acid group.

图 2 毛蕊花糖苷对棕榈酸处理的 HepG2 细胞线粒体膜电位的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of acteoside on the mitochondrial membrane potential of palmitic acid-treated HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

体上 LC3-II 蛋白相对表达水平显著升高 ($P < 0.05$); 与棕榈酸组相比, 棕榈酸 + 毛蕊花糖苷组 HepG2 细胞内线粒体上 LC3-II 蛋白相对表达水平显著升高 ($P < 0.05$), 见图 4。

3 讨论

代谢相关脂肪性肝病是一种以肝细胞脂肪变性和脂质蓄积为主要特征的临床病理综合征。近年来, 随着肥胖患者数目的日益增多, 代谢相关脂肪性肝病患者数量急剧上升, 目前患病率已达全球普通人群的 25.2%^[8]。研究证实, 线粒体功能受损是导

致代谢相关脂肪性肝病发病的一个重要因素^[9]。相关研究结果提示, 线粒体融合、分裂过程与代谢相关脂肪性肝病发展之间有相关性。在代谢相关脂肪性肝病患者肝脏中发现, 线粒体分裂过程加强, 同时线粒体融合减弱, 最终导致肝细胞内线粒体网络碎片化且功能失调。这种线粒体功能异常引起线粒体氧化磷酸化过程的减弱, 致使细胞内 ATP 生成减少, 使其更容易遭受氧化应激的损伤, 最终引发脂质聚集, 形成恶性循环^[10]。最近研究表明, 线粒体自噬途径是一种针对线粒体的特异性清除机

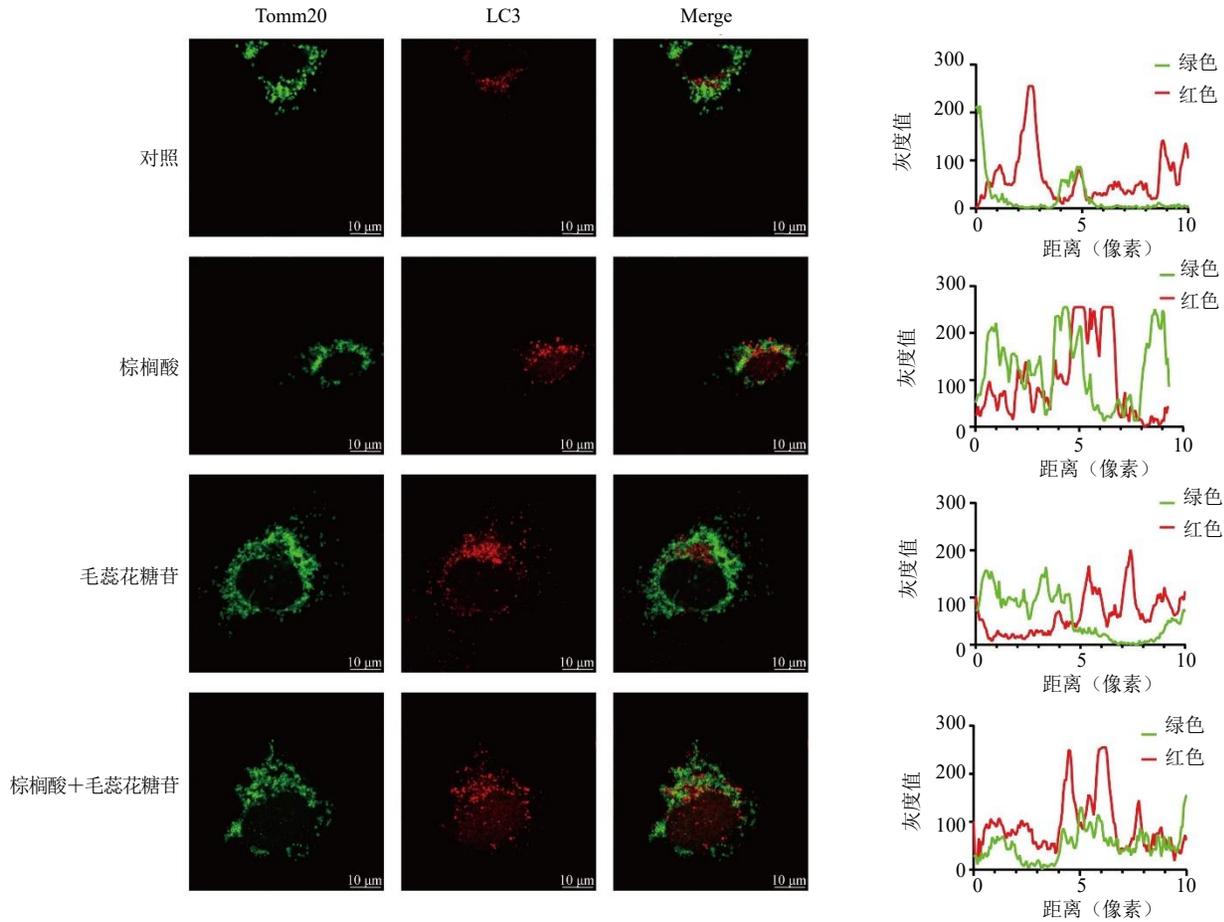
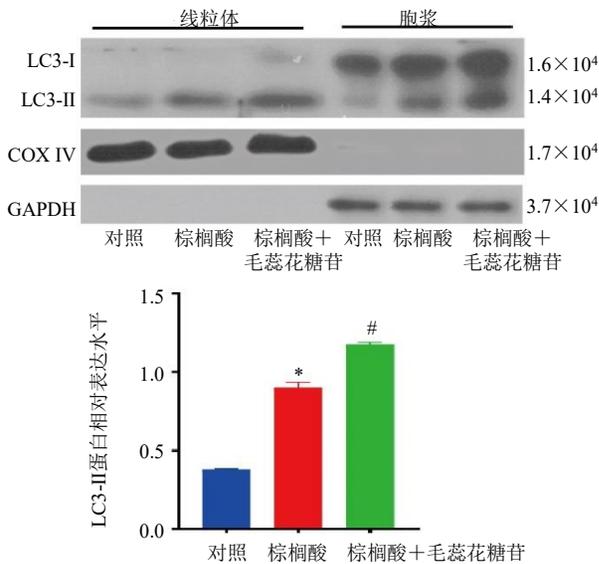


图 3 毛蕊花糖苷对棕榈酸处理的 HepG2 细胞 Tomm20 与 LC3 共定位的影响 (n = 3)

Fig. 3 Effect of acteoside on the co-localization of Tomm20 and LC3 in palmitic acid-treated HepG2 cells (n = 3)



与对照组比较: *P<0.05; 与棕榈酸组比较: #P<0.05.

*P<0.05 vs control group; #P<0.05 vs palmitic acid group.

图 4 毛蕊花糖苷对棕榈酸处理的 HepG2 细胞线粒体 LC3-II 蛋白水平的影响 (x ± s, n = 3)

Fig. 4 Effect of acteoside on the mitochondrial LC3-II protein level in palmitic acid-treated HepG2 cells (x ± s, n = 3)

制, 通过这种机制, 细胞内受损或功能失调的线粒体被清理, 从而严格控制细胞内线粒体的数量和质量, 维持细胞正常生理活性。在课题组前期的研究中, 发现毛蕊花糖苷对棕榈酸诱导的 HepG2 中具有显著改善脂质聚集的药理作用, 同时细胞内伴随有自噬过程被激活的现象。由于线粒体功能异常以及脂质聚集之间的相关性, 本研究在前期研究的基础上, 进一步研究毛蕊花糖苷对棕榈酸处理的 HepG2 细胞中对线粒体是否具有保护作用, 同时探讨线粒体自噬途径是否参与其药理活性。

在本研究中, 为了验证毛蕊花糖苷对棕榈酸处理的 HepG2 细胞是否具有线粒体保护作用, 利用线粒体超氧化物特异性荧光染料检测线粒体内超氧化物水平。结果提示, 利用棕榈酸处理 HepG2 细胞后, 线粒体内超氧化物水平较对对照组显著升高, 提示在 HepG2 细胞内棕榈酸诱导脂质聚集的过程中, 线粒体超氧化物水平显著增加。表明本研究中 100 μmol/L 棕榈酸处理的 HepG2 细胞可作为脂质

聚集过程中线粒体损伤细胞模型。另外,在单独使用 50 $\mu\text{mol/L}$ 毛蕊花糖苷干预 HepG2 细胞后,细胞线粒体内超氧化物水平较对照组无显著性差异,提示毛蕊花糖苷对 HepG2 细胞线粒体没有损伤作用。在此基础上,利用 50 $\mu\text{mol/L}$ 毛蕊花糖苷干预棕榈酸处理的 HepG2 细胞,结果显示,细胞线粒体中超氧化物水平较棕榈酸组显著降低,表明在 HepG2 细胞脂质聚集过程中毛蕊花糖苷发挥显著的线粒体保护作用。

在代谢相关脂肪性肝病中,线粒体功能异常不仅表现在线粒体超氧化物生成的增加,而且也会使得线粒体膜电位的改变。以往的研究结果显示,高脂饮食诱导的肝细胞脂质积累过程中,线粒体膜电位下降,影响线粒体能量代谢功能,导致线粒体 ATP 合成减少,细胞能量供应不足,影响肝细胞正常代谢和功能,进而促进代谢相关脂肪性肝病的发生发展。为进一步明确毛蕊花糖苷在 HepG2 细胞脂质积累过程中的线粒体保护作用,本研究检测了药物干预后线粒体膜电位水平的改变。结果显示,利用 100 $\mu\text{mol/L}$ 棕榈酸处理的 HepG2 细胞线粒体膜电位显著下降(表现为 JC1 绿色荧光增强、红色荧光减弱,绿色荧光灰度值与红色荧光灰度值比例升高),表明 HepG2 细胞脂质聚集过程中,线粒体功能下降,进而促进代谢相关脂肪性肝病的发生发展。使用 50 $\mu\text{mol/L}$ 毛蕊花糖苷干预 HepG2 细胞后, HepG2 细胞线粒体膜电位较空白对照组无显著性差异,表明毛蕊花糖苷对线粒体无损伤作用;同时,毛蕊花糖苷干预棕榈酸处理的 HepG2 细胞后, HepG2 细胞线粒体膜电位较棕榈酸组显著升高(表现为 JC-1 绿色荧光减弱、红色荧光增强,绿色荧光灰度值与红色荧光灰度值比例降低),表明毛蕊花糖苷在 HepG2 细胞脂质积累过程中发挥线粒体保护作用。

本研究结果发现,棕榈酸处理的 HepG2 细胞在脂质聚集过程中,细胞内线粒体出现超氧化物水平增加、膜电位显著下降等受损情况,然而毛蕊花糖苷干预后,显著改善了线粒体受损程度。为探讨毛蕊花糖苷在 HepG2 细胞脂质聚集过程中发挥的线粒体保护作用与线粒体自噬之间的相关性,本研究首先利用免疫荧光染色法检测自噬体标志性蛋白质 LC3 与线粒体之间的空间定位关系。结果显示,棕榈酸处理 HepG2 细胞后,细胞内线粒体形态不完整, LC3 与线粒体外膜特异性蛋白质 Tomm20 可观察到部分共定位关系,但整体上没有显著的空间共定

位关系。另外,单独使用毛蕊花糖苷干预 HepG2 细胞后,细胞内线粒体形态完整, LC3 与 Tomm20 没有共定位关系,这些结果进一步说明在棕榈酸诱导 HepG2 细胞脂质聚集过程中,确实会引起线粒体损伤,从而促进肝细胞内脂质积累。在利用 50 $\mu\text{mol/L}$ 毛蕊花糖苷干预棕榈酸处理的 HepG2 细胞后,细胞内线粒体形态明显改善, LC3 与 Tomm20 蛋白质在空间上存在显著的共定位关系,表明 HepG2 细胞在脂质聚集过程中,毛蕊花糖苷能够显著诱导自噬体的形成,并通过启动线粒体自噬途径,刺进自噬体包裹受损线粒体,进而清除受损线粒体,发挥线粒体保护作用。

LC3 在线粒体自噬中起着至关重要的作用,通过与受损线粒体上的特定信号分子结合、参与自噬体的形成以及与其他自噬相关蛋白相互作用,共同调节线粒体自噬的过程。众多研究表明, LC3 在不同的生理和病理状态下,都参与了线粒体自噬的调节,并且其表达水平的变化与线粒体自噬的程度密切相关^[11-13]。在自噬过程中, LC3 在自噬相关酶的作用下经历一系列的修饰和转化形成 LC3-I,随后与磷脂酰乙醇胺(PE)结合,转化为 LC3-II 并定位于自噬体膜上,其含量的变化通常被用作自噬活性的指标。为进一步研究毛蕊花糖苷的线粒体自噬活性,本研究通过提取线粒体蛋白质,并利用蛋白质免疫印迹技术检测了线粒体上 LC3-II 蛋白水平的变化。结果显示, HepG2 细胞在脂质聚集过程中,线粒体上 LC3-II 蛋白质表达水平较对照组显著升高,表明 HepG2 细胞脂质积累过程中引起的线粒体损伤可能作为一种应激信号,启动了细胞线粒体自噬程序,通过识别受损的线粒体,将其包裹进自噬体内,随后与溶酶体融合进行降解,防止其对细胞产生不良影响。这结果正好解释了 LC3 与 Tomm20 在空间上为何会出现部分空间上的共定位,这可能就是细胞的一种自我保护机制。毛蕊花糖苷干预后,线粒体上 LC3-II 蛋白质表达水平较棕榈酸组显著升高,表明毛蕊花糖苷可能通过诱导线粒体自噬,从而在 HepG2 细胞脂质聚集过程中发挥了线粒体保护作用。

综上所述,毛蕊花糖苷对棕榈酸处理的 HepG2 细胞在脂质聚集过程中发挥线粒体保护作用,通过激活线粒体自噬程序,清除受损线粒体,显著减少线粒体超氧化物水平,升高线粒体膜电位,抑制细胞线粒体去极化,并维持正常的线粒体结构。为毛

蕊花糖苷在治疗线粒体功能障碍相关疾病中的应用提供理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 范建高, 徐小元, 南月敏, 等. 代谢相关(非酒精性)脂肪性肝病防治指南(2024年版) [J]. 实用肝脏病杂志, 2024, 27(4): 494-510.
- [2] Saigo Y, Sasase T, Tohma M, *et al.* High-cholesterol diet in combination with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin induces NASH-like disorders in the liver of rats [J]. *Physiol Res*, 2023, 72(3): 371-382.
- [3] Hu Y C, Xu J Q, Chen Q, *et al.* Regulation effects of total flavonoids in *Morus alba* L. on hepatic cholesterol disorders in orotic acid induced NAFLD rats [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2020, 20(1): 257.
- [4] Brieger K, Schiavone S, Miller Jr F J, *et al.* Reactive oxygen species: From health to disease [J]. *Swiss Med Wkly*, 2012, 142: w13659.
- [5] Li R B, Toan S, Zhou H. Role of mitochondrial quality control in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(7): 6467-6485.
- [6] 黄文静, 谢兴亮, 盛艳梅. 毛蕊花糖苷药理作用及其制剂研发进展 [J]. 中草药, 2024, 55(23): 8256-8268.
- [7] 伊力亚斯·艾萨, 木塔力甫·艾买提, 任丽君, 等. 肉苁蓉活性成分毛蕊花糖苷通过诱导自噬对 NAFLD 的作用研究 [J]. 现代医药卫生, 2025, 41(3): 577-583.
- [8] Powell E E, Wong V W S, Rinella M. Non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Lancet*, 2021, 397(10290): 2212-2224.
- [9] Bórquez J C, Díaz-Castro F, Pino-de La Fuente F, *et al.* Mitofusin-2 induced by exercise modifies lipid droplet-mitochondria communication, promoting fatty acid oxidation in male mice with NAFLD [J]. *Metabolism*, 2024, 152: 155765.
- [10] Ramanathan R, Ali A H, Ibdah J A. Mitochondrial dysfunction plays central role in nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(13): 7280.
- [11] 孙文杰. PERK/Parkin 调控 LC3/PHB2 参与帕金森病线粒体自噬作用机制的研究 [D]. 洛阳: 河南科技大学, 2022.
- [12] Chu C T, Bayir H, and Kagan V E. LC3 binds externalized cardiolipin on injured mitochondria to signal mitophagy in neurons: implications for Parkinson disease [J]. *Autophagy*, 2014, 10(2): 376-378.
- [13] 王佳南, 林建安, 杜苗苗. 丹参酮 II_A 对急性心肌梗死大鼠心脏功能和心肌线粒体自噬的影响 [J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(4): 418-423.

[责任编辑 高源]